ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ФИКСИРОВАННОГО ШТАММА ВИРУСА БЕШЕНСТВА, ВЫРАЩЕННОГО В ПЕРЕВИВАЕМОЙ КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК

Т. А. АЛИЕВА, Р. ПОЛЧАЕВА
Азербайджанский Государственный Научно-Контрольный Институт Ветеринарных Препаратов

Бешенство остается одной из самых сложных ветеринарно-медицинских проблем и в последнее время привлекает все большое внимание специалистов. Основной мерой борьбы, наряду с проведением ветеринарно-санитарных и организационных мероприятий, является специфическая профилактика этого заболевания.

Совершенствование антирабических вакцин идет по пути повышения их иммуногенности, безвредности, разработки и внедрения количественных методов контроля активности и упрощения технологических процессов изготовления.

Как известно, существуют три типа вакцин против бешенства. К первому типу относятся вакцины, полученные на основе мозга взрослых или новорожденных животных. Вакцины этого типа обладают, как правило, остаточной вирулентностью и содержат большое количество балластных веществ. Вакцины второго типа готовят на развивающихся куриных, утиных, перепелиных эмбрионах. Однако эти вакцины контаминированы белком птиц. К третьему типу относятся вакцины, изготовленные на культуре как первичнотрипсинизированных, так и перевиваемых клеток. Они наиболее эффективны, безопасны, чисты, наименее токсичны и обладают менее выраженными локальными реакциями и общими осложнениями.

В настоящее время создание высокоиммуногенных культуральных антирабических вакцин по-прежнему остается актуальной проблемой в мировой антирабической практике. Решение этого вопроса требует тщательного изучения биологии и физико-химических свойств вируса бешенства, поиска оптимальной системы культуры клеток, в которой бы репродуцировался вирус, изучения различных условий, способствующих более высокому уровню накопления вируса в культуре клеток.

Адаптация рабического вируса к культуре ткани открыла новую эру в производстве антирабических вакцин. Появилась возможность получать высоконцентрированный и очищенный вирусный материал, не содержащий каких-либо энцефалотогенных протеинов и аллергических субстанций.

Среди большого набора использованных клеточных культур некоторые линии клеток оказались универсальными по своей чувствительности к вирусу бешенства и сохранению его вирулентности для животных (2). К таким клеточным культурам относятся клетки ВНК-21,Vero и 4647.

Для крупномасштабного приготовления вакцины против бешенства многие исследователи использовали линию перевиваемых клеток Vero, размножающуюся на микроносителях в суспензии. Результаты этих исследований свидетельствуют о высокой степени чистоты и стабильности данных вакцин и возможности их использования как для вакцинации животных, так и для иммунизации людей.

Референс-центр по бешенству Института Пастера (Франция) адапти-ровал шт. PV - Париж, прошедший II пассажей в мозге молодых кроликов к культуре клеток ВНК-21 и изготовил высокоэффективную вакцину для иммунизации животных (3).

R.J.Rudd с соавт. (1987), W.A.Webster с соавт. (1988) использовали клетки ВНК-21 для выделения уличного вируса бешенства (4, 5).

В клеточной системе ВНК-21 с успехом культивировали различные штаммы фиксированного вируса бешенства - "Рим", CVS, ОК-4, EPA, SAD. Исследователи отмечали, что по мере пассирования вирулентность вируса снижалась, а инфекция клеток возрастала.

Нами была изучена чувствительность различных перевиваемых клеточных культур к шт. "КП-85" фиксированного вируса бешенства. Для проведения вирусологических работ использовали следующие культуры перевиваемых клеток: почка эмбриона свиньи (СПЭВ); почка поросят

(ПК-15); почка поросенка казанская (ППК); почка овцы (ПО); почка эмбриона коровы (МДВК); почки обезьяны (Vero-E_6, CV-I, 4647); клетки невриномы Гассерова узла крысы (НГУК); почка однодневного сирийского хомячка (ВНК-21) и суспензионная линия ВНК-21 С13.

Из первично-трипсинизированных культур клеток использовали фибробласты эмбрионов японских перепелов (ЭЯП).

В работе использовали шт. "КП-85" фиксированного вируса бешенства и стандартный разрешающий шт. "CVS" фиксированного вируса бешенства.

Клеточные культуры выращивали в коммерческих питательных средах 199, 0,5% гидролизат лактальбумина (ГЛА), ИГЛА и ИГЛА МЕМ с добавлением глютамина. Для культивирования суспензионной линии ВНК-21С13 использовали среду RPMI-1640.

В ростовые питательные среды добавляли 5-10% инактивированной при 56^0С (в течение 30 минут) сыворотки крови КРС.

В качестве диспергирующих растворов применяли растворы версена (0,02 % -ный) и трипсина (0,25%-ный).

7,5% -ный раствор бикарбоната натрия использовали для поддержания pH среды в оптимальных значениях.

Для промывания культур клеток применяли солевые растворы Хенкса и Эрла.

В результате наших исследований наиболее чувствительной к указанному штамму вируса бешенства оказалась перевиваемая линия клеток ВНК-21. После ряда серийных пассажей вирус стабильно накапливался в этой клеточной системе в титре 7,5 lg $ЛД_{50/мл}$. Репродукция вируса в клетках происходила без признаков цитопатогенного действия. В процессе адаптации и дальнейшего культивирования вируса в клетках ВНК-21 были отработаны основные параметры репродукции - температурный режим культивирования, состав питательной среды, условия адсорбции вируса на клетках и т.д.

Проведенные нами исследования показали, что линии клеток ВНК-21 и ВНК-21С13 могут служить эффективной системой репродукции вируса при производстве культуральной антирабической вакцины.

При изучении биологических свойств культурального вируса нами было установлено, что после адаптации к культуре клеток шт. "КП-85" фиксированного вируса бешенства сохранил свои основные свойства - специфичность и инфекционную активность для животных.

Определение иммуногенности вируса производили количественным методом NIH (National Institutes of Health, США), рекомендованным комитетом экспертов ВОЗ по бешенству (1).

Иммуногенную активность живого культурального и мозгового вариантов вируса бешенства шт. "КП-85" изучали на беспородных мышах и мышах линии BALB весом 18-22 гр.

Этот метод основан на сравнении минимальной дозы испытуемой вакцины, защищающей 50% мышей с таковой международной или национальной референс-вакцины. Испытуемая вакцина признается эффективной, если индекс ее иммуногенности (ИИ) не ниже 1 МЕ. В наших опытах изучена иммуногенная активность шт. "КП-85"фиксированного вируса бешенства, выращенного на перевиваемых клетках ВНК-21 (8 пассаж), первичнотрипсинизированных клетках ЭЯП (3 пассаж), а также вируссодержащей мозговой суспензии 12 пассажа вируса на мышах-сосунках.

Для контрольного заражения животных использовали стандартный штамм "CVS" фиксированного вируса бешенства, разрешающая доза которого равнялась 70-100 $Лд_{50}$.

Степень иммуногенности вирусного материала определяли отношением $ЭД_{50}$ референс-вакцины к $ЭД_{50}$ испытуемого вируссодержащего материала. Интерпретацию результатов производили по показателю индекса иммуногенности.

Из вируссодержащего материала готовили пятикратные разведения: 1:5, 1: 25, 1:125, 1:625.Каждым разведением иммунизировали по 14 мышей внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл. Параллельно проводили иммунизацию мышей в том же порядке референс-вакциной с известным индексом иммуногенности. Иммунизацию проводили двукратно по схеме 0-7-14. Через 7 дней после второй иммунизации производили контрольное заражение всех иммунизированных мышей фиксированным вирусом бешенства шт. "CVS". Учет результатов осуществляли через 14 дней.

Как видно из таблицы, показатели иммуногенной активности были достаточно высокими: у вируссодержащей культу-

ральной жидкости шт. "КП-85", выращенного на перевиваемых клетках ВНК-21 ИИ равнялся 3,78 МЕ, на клетках ЭЯП - 7,32, индекс иммуногенности мозговой суспензии был равен 10,8 МЕ. Во всех случаях показатели ИИ намного превышали 1 МЕ, критерия, установленного ВОЗ. ИИ неконцентрированной антирабической вакцины из шт. "Щелково-51", использованной нами в качестве эталонного препарата был равен 2,2 МЕ.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что шт. "КП-85" фиксированного вируса бешенства, выращенный на перевиваемой клеточной культуре ВНК-21, обладает высокой иммуногенной активностью и может быть в дальнейшем использован для конструирования культуральной антирабической вакцины для иммунизации животных.

Таблица 1. Показатели иммуногенной активности культурального и мозгового вариантов фиксированного вируса бешенства шт. "КП-85".

NN пп	Наименование вирусного материала	Индекс иммуногенности (NIH)
1	Вируссодержащая культуральная жидкость от 8 пассажа шт."КП-85" фиксированного вируса бешенства на перевиваемой культуре клеток ВНК-21	3,78
2	Вируссодержащая культуральная жидкость от 3 пассажа шт. "КП-85" фиксированного вируса бешенства на первичнотрипсинизированных клетках ЭЯП	7,32
3	Вируссодержащая мозговая суспензия от 12 пассажа шт. "КП-85" фиксированного вируса бешенства на мышах-сосунках	10.8
4	Культуральная инактивированная антирабическая вакцина ВНИиТИБП из шт. "Щелково-51" на культуре клеток ВНК-21 (референс-вакцина)	2,2

ЛИТЕРАТУРА

1.Методы лабораторных исследований по бешенству. // ВОЗ, Серия монографий N 23, Женева, 1967, 180 с. 2.Matsumoto S., Kawai A. Comparative studies of development of rabies virus in different host cells. // Virology.1969, 39, N 3, p.449-459. 3 Roumantzeff M., Ajjan N. et al Cell culture rabies vaccines. // Comp. Immunol., Microbiol and Infect. Diseases , 1986, 9, N 1, p.10-11. 4.Rudd Robert J., Trimarchi Charles V. Comparison of sensitivity of BHK-21 and murine neuroblastoma cells in the isolation of a street strain rabies virus. 4.Webster W.A. , Charlton K.M. , Casey G.A. Crowth characteristics in cell culture and pathogenicity in mice of two terrestrial rabies strains indigenons to Canada. // Can. J. Microbiol., 1988, 34, N1, p.19-23.

QOYUNÇULUQDA YEMLƏMƏNİN SƏMƏRLİ FORMA ÜSULLARININ TƏTBİQ OLUNMASININ QOYUNLARIN MƏHSULDARLIĞINA TƏSİRİ

M.Q.BALAKİŞİYEV, B.M.OCAQQULİYEV,
kənd təsərrüfatı elmləri namizədləri
Azərbaycan ET Heyvandarlıq İnstitutu

Kənd təsərrüfatı ölkənin iqtisadiyyatında neftdən sonra mühüm bir sahə olmaqla daxili məhsulda 20% paya malikdir. Hazırda ölkə əhalisinin 49%-i kənddə yaşamaqla yanaşı əmək ehtiyatlarının 35%-dən çoxu kənd təsərrüfatı ilə məşğul olur.

2000-ci ilə qədər ölkədə mövcud olan ictimai mülkiyyətin özəlləşdirilməsi başa çatmış, iri buynuzlu qaramal, qoyun-keçilərin 99,2%-i özəlləşdirilərək pulsuz kəndlilərə paylanmışdır. Nəticədə həmin illə müqayisədə 2004-cü ildə iri buynuzlu mal-qaranın baş sayı 14,3%, qoyunların baş sayı 27,8% artması hesabına 2003-cü ildə ət (kəsilmiş çəkidə) 23,6%; süd 13,20%, yun (fiziki çəkidə 11,0% yüksəlmişdir.

Lakin təəssüflə qeyd olunmalıdır ki, yaradılmış yeni sistemdə qoyunçuluqda səmərəli yemləmə texkologiyasına əməl olunmadığından ekstersiv inkişaf tempi əhalinin qoyunçuluq məhsullarına olan tələbatını ödəmir.

Yeni sistemdə qoyunçuluğun inkişafına, məhsuldarlıq göstəricilərinin artırılmasına mənfi təsir edən əsas amillərdən biri onların il boyu, xüsusilə də, boğazlığın 1-ci dövründən başlayaraq laktasiya dövründə yemə olan tələbatının ödənilməməsidir. Bu problem respublikanın bütün bölgələrində qoyunçuluqla məşğul olan fermer təsərrüfatlarında mövcuddur. Bu problemi aradan qaldırmaq məqsədilə Beyləqan rayonunun «Qaraca» və «Hicran» KFT-da hər